

## 무름병에 감수성인 애기장대 돌연변이체 *Atstp1* 선발

최창현 · 김민갑 · 안일평 · 박상렬 · 배신철 · 황덕주\*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부 신작물개발과

### Selection of a Susceptible Line (Susceptible to *Pectobacterium 1*, *Atstp1*) to Soft-rot Disease in T-DNA Insertion Mutants Pool of *Arabidopsis*

Changhyun Choi, Min Gab Kim, Il Pyung Ahn, Sang Ryeol Park,  
Shin-Chul Bae and Duk-Ju Hwang\*

National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea

(Received on November 8, 2010; Accepted on November 20, 2010)

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) causes soft rot disease in various plants. Although many studies about *Pcc* have been going on, little is known yet about the defense genes from plants. To identify defense associated genes in response to *Pcc*, we screened about 20 thousand *Arabidopsis* T-DNA knock out lines by inoculation with *Pcc*. We obtained a line (*Atstp1*) showing more susceptible symptom compared to WT (Col-0) on 1 day after the inoculation of *Pcc* on leaves of *Arabidopsis* with toothpicks. In this study, we optimized the system to select resistant and susceptible lines to *Pcc* from T-DNA inserted pool of *Arabidopsis* and expect the system and *Atstp1* might be used for molecular breeding to produce resistant vegetables against *Pcc*.

**Keywords :** *Arabidopsis*, *Pcc*, *Pectobacterium*, Soft rot, T-DNA knock out lines

주요 채소작물에 병을 일으키는 세균성 무름병은 주요 채소에 다양하고 강력한 효소를 분비함으로써 식물을 분해하여 병을 발생시킨다(Whitehead 등, 2002; Roh 등, 2009). 이와 같은 무름병을 발생시키는 세균, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*)은 여름철 배추 생산에서 가장 큰 장애 요인이다. 거의 모든 식물에 침입할 수 있는 *Pcc*는 한번 잎에 감염되면 빠른 속도로 다른 조직에 전이되며, 주변 다른 식물체에도 병을 옮긴다. 이뿐만 아니라, 수확한 식물의 저장 및 유통 중에도 발병 및 전이될 정도로 방제가 어렵고 그 피해가 크다. 더욱이 토양에서 오랫동안 생존이 가능하기 때문에, 농약에 의한 방제 효과가 낮아 새로운 방제법 개발이 요구되고 있는 실정이다(Fritz와 Honma, 1987).

무름병에 민감한 채소는 대부분 신선채소로서, 특성상

친환경적이어야 하기 때문에 화학적 약제에 의한 방제에 의존하고 있던 기존방제 방법에서 벗어나기 위한 연구가 국내에서 진행되고 있다. 그 예로서, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21에 Tn5 전이인자를 무작위적으로 삽입한 돌연변이 라이브러리 스크리닝을 통해 선발한 비병원성 Pcc21-M15 돌연변이체가 배추의 *Pcc* 감염률을 저하시킴이 확인된 바 있으며, Pcc21로부터 분리한 박테리오파지(carocin D) 유전자의 형질전환 균주 생산을 통해 Pcc3에 이들 돌연변이 균주를 처리했을 때 배추의 병 발생이 낮아짐이 확인된 연구사례가 있다(Roh 등, 2009; Roh 등, 2010a; Roh 등, 2010b). 최근에 *Erwinia amylovora*로부터 분리한 harpin 단백질(HrpN<sub>Ea</sub>)을 이용하여 배추 근권에 살포해준 결과 배추 뿌리표면에 *Pcc*의 집합율이 낮아졌으며, quorum-sensing 신호물질의 억제 효과가 있음이 밝혀진 바 있다(Sun 등, 2010).

육종에 의한 저항성 품종 개발 연구 또한 활발히 진행되고 있는데, Ren 등(2001)은 repeated intercrossing을 통해 배추의 무름병 저항성을 확인하였으나, 이러한 기준

\*Corresponding author

Phone) +82-31-299-1742, Fax) +82-31-299-1722

Email) djhwang@korea.kr

육종법은 무름병에 대한 저항성 계통이 거의 없을 뿐만 아니라 육종방법이 갖고 있는 시간적, 노동집약적 문제로 인한 한계가 존재한다(Li, 1995).

그러므로 최근에는 분자육종 기술을 통한 배추무름병 저항성 품종개발이 각광을 받고 있다. Jung 등(2008)은 pineapple fruit bromelain 유전자(*BA1*)를 배추에서 과발현을 통해 저항성 증진효과를 확인하였으며, Vanjildorj 등(2009)에 의한 연구에서는 *Bacillus* sp. GH02로부터 분리한 AHL-lactonase gene(*Aii* gene)을 배추에 형질전환하여 *Pcc*의 생장이 억제된 저항성 계통의 배추를 생산함으로써, 무름병 방제 연구의 방향을 제시하였다.

그러나, 이러한 활발한 연구에도 불구하고 무름병에 대한 식물에서 발견된 저항성 유전자는 드물다. 따라서 본 연구에서는, 애기장대로부터 무름병에 저항성인 유전자를 찾고자, T-DNA 삽입 돌연변이 2만여개의 애기장대를 분양 받았고, 이 식물 전체에 *Pcc*를 이용한 스크리닝 방법을 체계화 하였으며, *Pcc*에 감수성인 돌연변이 개체를 선발하였다. 이 연구에서 소개한 *Pcc*에 대한 애기장대 스크리닝 방법과 그 방법을 통해 확보한 knock out 돌연변이가 배추 무름병 저항성 품종 개발에 중요한 육종 소재가 될 것으로 기대한다.

## 재료 및 방법

**애기장대 돌연변이군 생육 및 *Pcc* 스크리닝.** ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)로부터 애기장대 T-DNA 삽입 돌연변이군(Stock number: CS76501)을 분양 받아 52 × 25 × 5(cm) 포트 5개에 상토를 채운 후 종자를 모두 나누어 뿌린 다음 4°C 저온실에 하룻밤 두어 발아를 촉진하였다. 다음날 16 hr/8 hr의 광주조건과 25°C의 생장장에 두어 1달간 건강히 생육시킨 후 *Pcc* (*Petobacterium carotovorum* SCC1)를 접종하여 스크리닝 하였다. 1차 선발을 통하여 저항성 또는 감수성으로 나타난 개체는 감염부위를 제거한 후 종자를 수확하였다. 이렇게 선발된 개체로부터의 종자는 각각 6개 식물체씩 동일한 포트에서 발아시켜 대조구인 Col-0와 함께 2차 스크리닝을 하였다. 대조구와 비교하여 저항성 또는 감수성으로 나타난 계통은 계통 중에 가장 그 현상이 가장 뚜렷한 개체에서 종자를 수확하고 3차 스크리닝을 위해 6개체를 발아시켰다. 3차 스크리닝에서도 2차 스크리닝과 같이 6개체 모두에서 감수성 또는 저항성을 보인 line을 선발하고 그 중 가장 대표적인 개체로부터 종자를 확보하여 보관하였다.

***Pcc* 접종.** 5 ml의 액체 LB배지에 단일 콜로니의 *Pcc*를 접종하여 30°C에서 밤새 키웠다. 다음날 5 ml의 동일

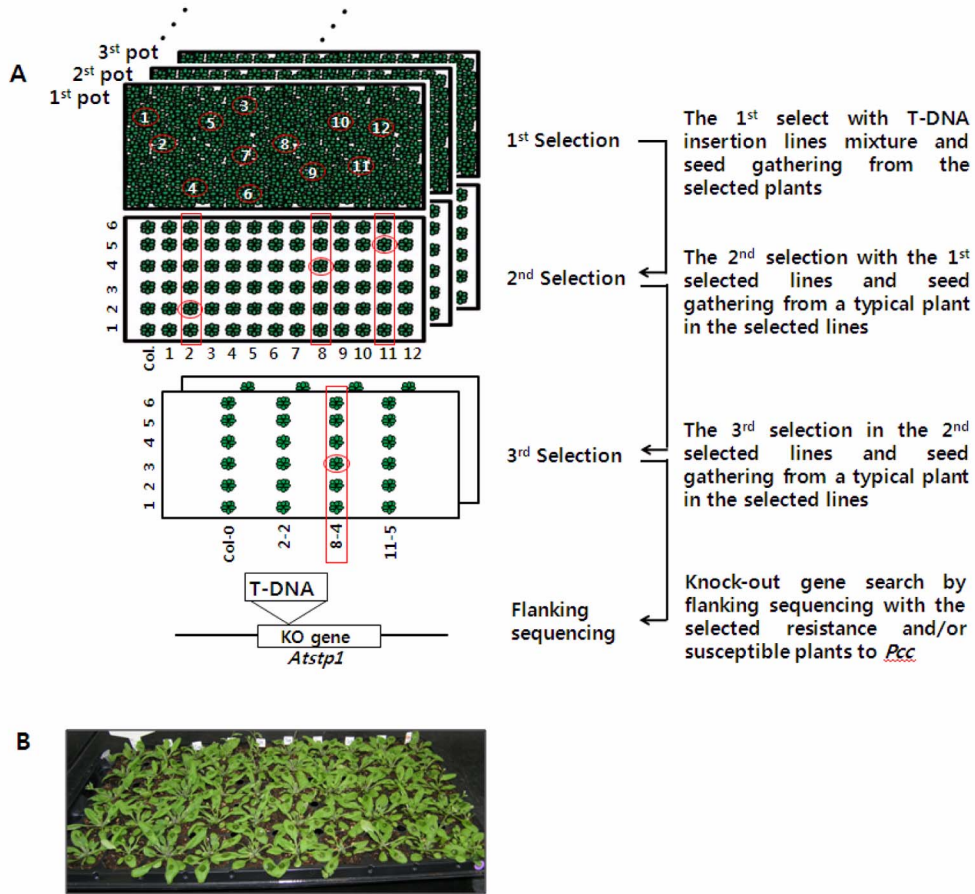
배지에 그 배양액을 1/100로 희석되게 재접종하여 약 3~4 시간 더 배양하였다. 원심분리를 통해 *Pcc*를 pellet으로 만든 후, 멸균한 5% sucrose 용액으로 현탁시켜 OD<sub>600</sub>에서 0.02가 되도록 하였다. 충분한 물을 준 애기장대에 *Pcc*를 접종하기 위하여, 멸균한 이쑤시개를 이용하였다. *Pcc*가 담겨있는 튜브에 이쑤시개를 깊숙히 담구어 *Pcc* 현탁액이 그 이쑤시개 끝에 맺히게 한 후 애기장대 한 개체당 세 잎씩 정중앙에 상처를 남과 동시에 접종하였다. 이때 상처가 잎에 구멍을 내지 않게 하고, *Pcc* 현탁액이 그 상처 위에 맺히게 하였다. 접종을 마치고 조심스럽게 100% 습도, 25°C 및 암조건이 유지되는 생장상으로 포트를 옮기어 하룻밤 동안 병을 유도하고, 다음날 병징을 비교하여 저항성 및 감수성의 개체를 선발하였다.

## 결과 및 고찰

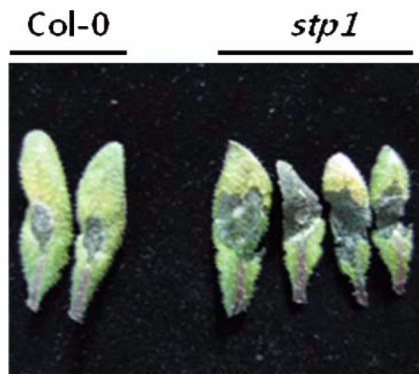
대부분의 무름병 방제를 위한 연구에서는 *Pcc*에 길항작용을 하는 다른 미생물을 이용하거나 길항성 물질을 동정하여 방제하는 친환경 방제법에 대한 연구가 지배적이다. *Pcc* 저항성 유전자 탐색 또한 그 길항작용을 나타낸 미생물로부터 유용 유전자를 동정하여 저항성 식물을 만드는 연구가 진행되고 있다. 그러나 본 연구에서는 애기장대의 무름병 관련 저항성 유전자를 탐색하고자 2만여개의 T-DNA 삽입 돌연변이군을 이용하여 각각의 식물에 *Pcc* 처리함으로써 *Pcc*에 저항성 유전자를 탐색하고 그 수행과정을 체계화하였다.

Fig. 1에서와 같이 2만여 개체의 애기장대 돌연변이를 5개의 포트에 파종 후 *Pcc*를 처리하여 1차 스크린한 결과 15개체의 저항성 개체와 20개체의 감수성 개체를 선정할 수 있었다. 이 개체로부터 종자를 얻기 위하여 병을 접종한 잎을 제거하였고, 이후 종자를 얻어 파종 후 정상적으로 성장한 6개체를 선정하여 Col-0와 함께 2차 병검정을 실시하였다(Fig. 1A, B). 2차 병검정에서 3개체의 저항성 line과 감수성 4개 line을 Col-0와 비교해 선정할 수 있었으며 각 line 중 가장 대표적인 병징이 나타난 개체만을 선정하여 재종하였다. 2차 선발에서 얻은 종자를 파종하여 3차 선발에서도 2차 때와 동일하게 병 검정을 진행하였으며, 1개체의 감수성 line (susceptible to *Pectobacterium*, *stp1*)을 선정할 수 있었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Pcc* 처리 1일 후 Col-0에서는 대부분이 직경 0.5 cm 미만의 병징을 나타낸 반면, *stp1*의 경우에는 그 크기를 정확히 잴 수 없을 정도로 잎이 감염되어 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통해 2만여개의 돌연변이 개체군에서 3차 선발을 통해 1개체에서 *Pcc*에 감수성인 line을 선발할 수



**Fig. 1.** Schematic representation of experimental procedure to select susceptible and resistant lines to *Pcc* in T-DNA insertion pool of *Arabidopsis* (A) and typical picture for the 2<sup>nd</sup> selection (B).



**Fig. 2.** Typical leaves showing disease symptoms in Col-0 and *stp1* on 1 day after inoculation with *Pcc*.

있었다. 1차 선발에서 30개의 저항성 및 감수성 line은 대부분이 실험적 오차였음을 알 수 있었다. 그 이유로는 우선 많은 개체에 집중할 시 발생하는 오차일 것으로 생각되며, 또한 line 당 개체수가 1개이기 때문일 것으로 추정하였다. 따라서 1차 선발에서 선발된 30개체 돌연변이

는 2차 선발에서 7개 line으로 줄었으며, 이들 7개 line 중에 3차 선발에서 단지 1개체(*stp1*)가 *Pcc*에 감수성으로 확인되었다. *stp1*은 나머지 6개 line에서와 달리 병 처리에 이용된 6개체 모두에서 유사한 병징을 얻었고, 나머지 6개체에서는 line 내에서 오차가 크거나 병징의 크기가 미비했다. 이는 실험적 오차뿐만 아니라 유전적으로 고정되지 않은 결과라 생각되었다.

본 연구를 통하여 얻은 *stp1*은 앞으로 flanking sequencing을 통하여 knock out된 유전자를 구명할 것이며, 다양한 분자생물학적 연구를 통하여 무름병 연구를 위한 소재로 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

### 요 약

본 연구는 애기장대에서 무름병에 대한 저항성 유전자를 탐색하고자 2만여개의 T-DNA 삽입 돌연변이군을 이용하여 *Pcc*에 대한 스크리닝을 수행하고 이 방법을 소개한 연구다. 1차 선발을 통하여 15개의 저항성 line과 20

개의 감수성 line을 선발하였으며, 이로부터 2차 선발하여 3개의 저항성 line과 4개의 감수성 line을 선발하였고, 최종적으로 3차 선발을 통하여 1개의 감수성 line (*Atstp1*)을 선발할 수 있었다. 현재 *Atstp1*을 이용해 flanking sequencing 하여 유전자를 탐색하고 있으며, 앞으로 클로닝을 통하여 다양한 무름병 저항성 식물 개발에 유용하게 이용될 것으로 기대한다.

## 감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 아젠다 과제(PJ006775201002)와 작물유전체기능연구사업 과제(CG3134-1) 연구비로 수행하였으며 이에 감사를 포함합니다.

## 참고문헌

- Fritz, V. A. and Honma, S. 1987. The effect of raised beds, population densities, and planting date on the incidence of bacterial in Chinese cabbage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 112: 41-44.
- Jung, Y. J., Choi, C. S., Park, J. H., Kang, H. W., Choi, J. E., Nou, I. S., Lee, S. Y. and Kang, K. K. 2008. Overexpression of the pineapple fruit bromelain gene (BAA) in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa*) results in enhanced resistance to bacterial soft rot. *Elec. J. Biotech.* 11(1).
- Li, S. D. 1995. Progress in disease resistant breeding of main vegetables. *Science Press, Beijing.* pp. 96-100.
- Ren, J. P., Petzoldt, R. and Dickson, M. H. 2001. Genetics and population improvement of resistance to bacterial soft rot in Chinese cabbage. *Euphytica* 117: 197-207.
- Roh, E., Lee, S. and Heu, S. 2010. Suppression Effect on Soft-rot by Bacteriocin-producing Avirulent *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21-M15. *Res. Plant Dis.* 16: 136-140.
- Roh, E., Lee, S., Lee, Y., Ra, D., Choi, J., Moon, E. and Heu, S. 2009. Diverse Antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 42-50.
- Roh, E., Park, T. H., Kim, M. I., Lee, S., Ryu, S., Oh, C. S., Rhee, S., Kim, D. H., Park, B. S. and Heu, S. 2010. Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc21. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7541-7549.
- Sun, L., Wang, X., Qu, S., Liu, H., Jia, Z. and Dong, H. 2010. HrpN<sub>Ea</sub> induces Chinese cabbage resistance to bacterial soft rot by inhibiting the bacterial attachment to root surfaces. *Plant Dis.* 94: 1441-1447.
- Vanjildorj, E., Song, S. Y., Yang, Z. H., Choi, J. E., Noh, Y. S., Park, S., Lim, W., J., Cho, K. M., Yun, H. D. and Lim, Y. P. 2009. Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) inbred line, Kenshin. *Plant Cell Rep.* 28: 1581-1591.
- Whitehead, N. A., Byers, J. T., Commander, P., Corbett, M. J., Coulthurst, S. J., Everson, L., Harris, A. K., Pemberton, C. L., Simpson, N. J., Slater, H., Smith, D. S., Welch, M., Williamson, N. and Salmond, G. P. 2002. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 223-231.